

⑩ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ Offenlegungsschrift
⑩ DE 198 05 788 A 1

⑤ Int. Cl. 6:
C 12 N 15/11
C 07 H 21/04
A 61 K 48/00
// A61K 51/00

⑦ Anmelder:
Loos, Ulrich, Prof. Dr.med., 89081 Ulm, DE
⑧ Vertreter:
Andrae Flach Haug, 81541 München

⑦ Erfinder:
Loos, Ulrich, Prof. Dr., 89081 Ulm, DE; Behr,
Michael, Dr., 89584 Ehingen, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

⑨ Promotor-DNA und ihre Verwendung
⑩ Wir haben genomische DNA von einer humanen Genbibliothek kloniert und sequenziert, die sich 1300 Basenpaare stromaufwärts der 5'-untranslatierten Sequenz des Gens für den Natrium-Jodid-Symporter (NIS) erstreckt. In transienten Transfektionsassays zeigte diese Sequenz Promoter-Aktivität, die durch gezielte Deletionen auf Nukleotid -443 bis -395 relativ zum ATG-Startcodon eingeschränkt werden konnte. Dieser "minimale" Promoter, der eine putative GC- und TATA-Box einschließt, war in der Ratten-Schildrüsenzelllinie FRTL-5 sehr aktiv, aber auch in geringerem Ausmaß in COS-7 und CHO-Zellen, die keine Schilddrüsenmerkmale aufweisen. Er war homolog zu einer korrespondierenden Sequenz im NIS-Gen aus der Ratte, weist aber keine Ähnlichkeit zu anderen Promotoren von schildrüsenspezifischen Genen auf.

DE 198 05 788 A 1

BEST AVAILABLE COPY

DE 198 05 788 A 1

Beschreibung

EINLEITUNG

Die Aufnahme von Jod in die Schilddrüse ist Voraussetzung für die Synthese der Schilddrüsenhormone T3 und T4. Daneben wird dieser Prozeß bei der Radiojod-Therapie von Schilddrüsentumoren ausgenutzt. Die Jodaufnahme in die Schilddrüse ist ein aktiver Prozeß, der durch das Protein Natrium-Jodid-Symporter (NIS) geleistet wird; einem Protein, das kürzlich kloniert wurde (1, 2). Expression von NIS wurde vorwiegend in der Schilddrüse gefunden, in einem geringeren Ausmaß aber auch in der Brustdrüse und im Ovar (3). Die NIS-Expression ist in Schilddrüsenkarzinom und in transformierten Zell-Linien aus der Schilddrüse stark vermindert. Folglich sind viele Schilddrüsen-Karzinome nicht der Radiojod-Therapie zugänglich. Jodaufnahme und NIS-Gehalt in Schilddrüsenzellen werden durch TSH bzw. cAMP erhöht, was auf vermehrte Genexpression zurückzuführen scheint (4). Es gibt aber praktisch keine Informationen über die transkriptionelle Regulation des humanen NIS-Gens. Um die molekularen Mechanismen dieser Regulation zu verstehen, haben wir den Promotor des NIS-Gens kloniert, sequenziert und charakterisiert. Transfektions-Assays mit Reportergen-Konstrukten wurden in Schilddrüsen- und Nicht-Schilddrüsenzellen durchgeführt um die Gewebsspezifität der Genexpression zu bestimmen.

MATERIAL UND METHODEN

PCR und DNA-Sequenzierung

Um den Promotor am 5'-Ende des NIS-Gens zu klonieren, verwendeten wir das gene-walking human genomic library system von Clontech (Heidelberg). Zwei aufeinanderfolgende PCR's wurden an 5 Bibliotheken von unklonierten, aber adapterliierten genomicischen DNA-Fragmenten durchgeführt. Jede dieser Bibliotheken war durch Verdau mit einem spezifischen Restriktionsenzym entstanden. Neben den adaptorspezifischen 5'-Primern AP1 und AP2, wurden 3'-Primer verwendet, die komplementär zur untranslatierten cDNA waren. Der NIS-spezifische 3'Primer NIS1 (5'-CCTCCCTGTCCCCGCTGTCTCTGC-3') war an der Position 142 der 5'-untranslatierten Region des NIS-Gens lokalisiert, während der "nested" Primer für die zweite PCR (NIS2, 5'-TGCTGTCTGTCTGCCACCTCCCC-3') an Position 105 der publizierten NIS-cDNA war (2). Das Protokoll von Clontech wurde genau befolgt, außer daß etwas längere Zeiten für die Amplifikation verwendet wurden.

Ein PCR-Produkt, das mit diesen Primern aus der SspI-Bibliothek vervielfältigt wurde, wurde in den TA-cloning vector pCR2.1 (Invitrogen, Leek, Netherlands) kloniert. Dieses Insert wurde in beiden Richtungen bei der Fa. Eurogentec (Seraing, Belgium) sequenziert. Um nach putativen Promotor-Elementen zu suchen, wurde eine Computer-Sequenzanalyse durchgeführt mit dem EUKPROP-Programm von PC/GENE version 6.5 software package (IntelliGenetics). Nukleotid-Homologien wurden mit dem Programm GCG (University of Wisconsin, Madison, WI) analysiert.

Konstruktion von Expressions-Vektoren

Basierend auf diesen Computer-Analysen wurden drei Teile dieses genomicischen Klons weiter in den Luciferase-Reporter-Vector pGL3-Basic kloniert (Promega, Mannheim), a) ein 1459-nt EcoRI-Fragment, das die gesamte genespezifische Sequenz von 1402 Nukleotiden enthält (pGL-

N1), b) ein 850-nt EcoRI/XbaI-Fragment, das ungefähr die 5'-Hälfte enthält mit 804 NIS-spezifischen Nukleotiden (pGL-N2) und c) ein 612-nt XbaI/EcoRI-Fragment, das die 3'-Hälfte mit 602 NIS-spezifischen Nukleotiden (pGL-N3) nahe dem Translationstartcodon des NIS-Gens enthält. Diese Fragmente wurden aus dem genomicischen Klon ausgeschnitten, mit Klenow-Polymerase glattendig gemacht und in die the SmaI-Site von pGL3-Basic in "sense"- und "antisense"-Orientierung ligiert. Die Orientierung der jeweiligen Fragmente wurde durch Restriktionsverdau mit geeigneten Enzymen nachgewiesen. pGL-N3 wurde weiter für eine Serie von gerichteten Deletionen verwendet, wobei die folgenden Restriktionsenzyme angewandt wurden, a) SacI (-117 bp, pGL-N4), b) NheI/BlnI (-408 bp, pGL-N5), c) SmaI (-436, pGL-N7), d) NheI/EspI (-513 bp, pGL-N8). Zusätzlich wurde ein PvuII-Fragment entfernt, was in einer Deletion von 256 bp resultierte (pGL-N6). Alle Konstrukte sind schematisch in Abb. 2 dargestellt.

Zellkultur und Transfektionsassays

FRTL-5 Ratten-Schilddrüsenzellen (erhalten von Dr. M. Derwahl, Bochum) wurden in Coon's modified Ham's F12 medium (Biochrom, Berlin) kultiviert, welches 5% Kälberserum (Gibco Life Technologies, Eggenstein) und eine Mischung von 6 Hormonen und Wachstumsfaktoren enthielt: Glycyl-L-histidyl-L-lysine acetate (10 ng/ml), Hydrocortisone (3.6 ng/ml), Somatostatin (10 ng/ml), Insulin (10 µg/ml), Transferrin (5 µg/ml) und Rinder-TSH (10 mU/ml). Als Antibiotika wurden Gentamicin (50 µg/ml) und Amphotericin B (1.25 µg/ml), beide von Gibco, verwendet. COS-7 und CHO-Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagle Media (Gibco) kultiviert, welches 5% FCS (Gibco), Gentamicin (50 µg/ml) und Amphotericin B (1.25 µg/ml) enthielt.

2×10^5 FRTL-5 Zellen und 1×10^5 of COS-7 Zellen wurden in 35-mm-Platten 48 bzw. 24 Std. vor der Transfektion ausgesät. Jede Transfektion wurde mit der Calcium-Phosphat-Methode ausgeführt und enthielt 6 µg des jeweiligen genomicischen DNA-Fragmentes zusammen mit 1 µg des pSV-βGAL-Vectors (Promega, Mannheim). Ein Luciferase-Vektor mit SV40-Promotor und -Enhancer-Sequenzen diente als positive Kontrolle. Nach der Transfektion wurden die Zellen für 48 Std. inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit einem Gefrierzyklus in Lysepuffer aufgeschlossen und mit jeweils 50 µl des Extraktes wurden die Aktivitäten von Luciferase und β-Galactosidase bestimmt. Die im Luminometer gemessenen relativen Lichteinheiten wurden auf die β-Galactosidase-Werte normalisiert (vgl. auch Referenz 5). Die Experimente wurden drei- bis viermal in Triplikat- oder Quadruplikatbestimmungen durchgeführt. Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben. Die Werte werden als Vielfaches im Verhältnis zum pGL3-Basic angegeben, der als 1 gesetzt wird.

ERGEBNISSE

Klonierung und Sequenzierung des putativen NIS-Gen-Promoters

Ein PCR-Produkt, das die 5'-flankierende Region des NIS-Gens enthielt, wurde aus einer humanen Genbibliothek mit "downstream"-Primern amplifiziert, die komplementär zur untranslatierten cDNA-Sequenz (2) waren. Nach der Klonierung in den Vektor pCR2.1 wurde dieses DNA in beide Richtungen sequenziert. Es ergaben sich 1402 genespezifische Nukleotide, die eine überlappende Region am 5'-Ende mit vollständiger Identität von 104 Basenpaaren zur

publizierten NIS-cDNA aufwiesen. Damit ist bewiesen, daß die klonierte Sequenz spezifisch für das NIS-Gen ist. Die publizierte cDNA, die sich bis zum Nukleotid -347 erstreckt, wurde somit um 1300 Basenpaare erweitert bis zum Nukleotid -1644 relativ zum ATG-Startcodon. Die vollständige Nukleotidsequenz des genomischen Klons ist in Abb. 1 wiedergegeben. Die Sequenz weist einen hohen G/C-Gehalt von 54% auf und zeigt ein nicht-kanonisches TATA-Box-Motiv AATAAAT (Nukleotid -404 bis -398), dem eine GC-Box vorgelagert ist. Bemerkenswert sind die vier CpG-Dinukleotide, die alleine in der kurzen Sequenz (18 Basenpaare) zwischen diesen Elementen vorhanden sind. Eine weitere Kopie der ungewöhnlichen TATA-Box befindet sich bei Nukleotid -1079, liegt aber in einer anderen Sequenzumgebung. Es wurden keine Consensus-Sequenzen für die Bindung von T3-Rezeptor und cANP²-Bindeprotein gefunden.

Transkriptionelle Eigenschaften der Reporteren-Konstrukte

Wir analysierten die Promotor-Aktivität unseres genomischen Klons durch transiente Transfektion mit Reporteren-Konstrukten. Die gesamte DNA-Sequenz und zwei Hälften davon wurden mit dem Luciferase-Expressionsvektor pGL3-Basic fusioniert, der keine regulatorischen Elemente aufweist. Alle in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte sind in Abb. 2 dargestellt. Diese Hybrid-Vektoren wurden in die Ratten-Schilddrüsenzelllinie FRTL-5 transfiziert und die transkriptionelle Aktivität anhand der Luciferase-Aktivität gemessen. Die kleinere Sequenz zeigte beträchtliche Promotoraktivität, die ausschließlich in der 3'-Hälfte (pGL3-N3) lag. Dieser Vektor erhöhte die Luciferase-Aktivität 17fach im Verhältnis zum zugrundeliegenden Vektor pGL3-Basic (Abb. 3A). Diese Aktivierung war spezifisch, da dieselben Sequenzen in "antisense"-Richtung kloniert keine Aktivität zeigten. Die Daten für die 5'-Hälfte der Sequenz deuten auf die Anwesenheit eines Repressors hin, da die Transkription im Vergleich zum Basic-Vektor sogar deutlich unterdrückt wurde.

Ähnliche Resultate wurden erhalten, wenn die erwähnten Fragmente in einen Luciferase-Vektor kloniert wurden, der schon Enhancer-Elemente enthält (nicht gezeigt).

Vergleichende Promotor-Analyse in verschiedenen Zelltypen

Um die gewebsspezifische Regulation des NIS-Gens zu untersuchen, transfizierten wir auch COS-7 und CHO-Zellen mit den beschriebenen Reporteren-Konstrukten (Abb. 3B). Diese beiden epithelialen Zell-Linien stammen nicht aus der Schilddrüse und exprimieren auch kein NIS-Gen. Promotoraktivität von pGL3-N1 und pGL3-N3 wurde auch in COS-7 beobachtet, aber in einem etwas geringeren Ausmaß als in FRTL-5. In CHO-Zellen war die transkriptionelle Aktivität um das 4- bis 5fache geringer. Die Proportionen zwischen den verwendeten Konstrukten und ihre Abhängigkeit von der Orientierung war in allen Zell-Linien ähnlich. Beim Vergleich der Luciferase-Aktivitäten zwischen den verschiedenen Zell-Linien muß auch die unterschiedliche Transkriptionseffizienz berücksichtigt werden. Zum Vergleich verwendeten wir auch einen Kontrollvektor mit SV40-Promotor und -Enhancer-Sequenzen. Obwohl wir die Luciferase-Werte durch die ebenfalls gemessenen β -Galactosidase-Aktivitäten normalisierten, zeigte sich ein großer Unterschied zwischen FRTL-5 und CHO-Zellen auf der einen und COS-7-Zellen auf der anderen Seite (25- bis 35fach gegenüber 2865fach x pGL3-Basic). Dieser große Unter-

schied ist sicherlich auf die Anwesenheit vom SV40-Sequenzen in COS-Zellen zurückzuführen.

Zusammenfassend kann man sagen, daß die klonierte Sequenz starke Promotor-Aktivität in Schilddrüsenzellen wie FRTL-5 zeigt, aber auch in Nicht-Schilddrüsenzellen zu einem gewissen Grad aktiv ist.

Weitere Einengung der Promotor-Sequenz

10 Eine Serie von 5'-Deletionen unserer genomischen Sequenz (vgl. Abb. 2) wurde konstruiert, um die Grenzen des putativen Promotors genauer einzuschränken. Deletionen bis zu Nukleotid -443 (pGL3-N6) wiesen noch beträchtliche Promotor-Aktivität in FRTL-5 und in entsprechendem Ausmaß in COS-7 auf (Abb. 4). Die Deletion pGL3-N7, in der die GC-Box direkt vor der putativen TATA-Box entfernt war und die Deletion pGL3-N8, bei der sowohl die GC- als auch die TATA-Box entfernt war, zeigten keine Promotor-Aktivität mehr. Dies beweist, daß diese Elemente funktional aktiv sind und daß die Region von Nukleotid -443 bis -395 notwendig und hinreichend sind, um einen Promotor darzustellen.

25 Es ist sehr aufschlußreich, die vorliegende humane Sequenz mit der 5'-flankierenden Region des NIS-Gens aus der Ratte zu vergleichen, welche vor kurzem publiziert wurde (6, 7). Während die ganze Sequenz nur 41,5% Identität aufweist, erreicht diese 75% in der oben genannten Region (Abb. 5). Insbesondere die funktionellen Elemente TATA- und GC-Box sind absolut identisch. Im Vergleich zur Ratte zeigt die humane cDNA eine sehr lange 5'-untranslatierte Sequenz. In Analogie zum Ratten-Gen, wo der Transkriptionsstart bei Nukleotid -98 markiert wurde, würde die Transkription beim humanen Gen bei Nukleotid -377 relativ zum ATG-Startcodon beginnen.

DISCUSSION

Die vorliegende Studie beschreibt die Sequenzierung und Charakterisierung der 5'-flankierenden Region des humanen NIS-Gens. Mittels einer auf der PCR basierenden Methode wurde die genomische DNA bis zum Nukleotide -1644 relativ zum Startcodon kloniert. Die 3'-Hälfte dieser Sequenz zeigte nach Umklonieren in einen Luciferase-Expressionsvektor starke Promotor-Aktivität. Indem wir eine Reihe von Deletionskonstrukten in transzierten Transfektionsassays testeten, konnten wir den Promotor auf eine kurze Region einengen, die 40 Basenpaare stromaufwärts der TATA-Box beginnt und ungefähr 50 Basenpaare umfaßt. Dieser "minimale" Promotor war in Schilddrüsenzellen sehr aktiv, in geringerem Ausmaß aber auch in Nicht-Schilddrüsenzellen. Neben den oben erwähnten Elementen TATA- und GC-Box konnten wir nur noch eine Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor AP-1 in dieser Sequenz finden (vgl. Abb. 5). Interessanterweise ist genau diese Region sehr ähnlich der korrespondierenden Region im Promotor des NIS-Gens aus der Ratte (6, 7), wobei die restliche 5'-flankierende Sequenz wenig Homologie zeigt. An schilddrüsenspezifischen Transkriptionsfaktoren konnten wir nur zwei potentielle Bindungsstellen für TTF-1 entdecken, deren Signifikanz aber nach unseren Ergebnissen fragwürdig ist. Diese Sequenzeigenschaften des humanen NIS-Promotors sind sehr verschieden von denen anderer schilddrüsenspezifisch exprimierter Gene, die normalerweise mehrere Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren TTF-1, TTF-2 und PAX-8 aufweisen (Übersichtsartikel: 8).

Die Frage der Gewebsspezifität ist auch deshalb schwer zu beantworten, weil es kein authentisches zelluläres Modell für die humane Schilddrüse gibt. In der Ratte ist ein sol-

ches Modell verfügbar mir der kontinuierlichen aber differenzierten Zell-Linie FRTL-5, die ja auch in der vorliegenden Studie verwendet wurde. Es gibt auch schon zwei Untersuchungen über den endogenen NIS-Promotor an diesen Zellen, die aber zu völlig verschiedenen Ergebnissen hinsichtlich der Frage kommen, wie das NIS-Gen gewebsspezifisch reguliert wird (6, 7). Eine in Transfektionsassays nicht beobachtbare Gewebsspezifität könnte auf der Gegenwart von gewebsspezifisch regulierten Enhancer-Sequenzen beruhen, die außerhalb der klonierten Sequenz liegen. Daneben ist für viele Gene ein großer Einfluß der Chromatinstruktur bzw. der Methylierung auf die Genexpression nachgewiesen worden. Das Vorhandensein von CpG-Dinukleotiden im NIS-Promotor, die in 40% aller gewebsspezifisch regulierten Gene CpG-Inseln um den Transkriptionsstart herum bilden, deutet auf eine Rolle für die Methylierung bei der transkriptionellen Regulation des NIS-Gens hin. Jedenfalls eröffnet die vorliegende Studie, in der der Promotor des humanen NIS-Gens erstmals kloniert und charakterisiert wurde, weitere Möglichkeiten zur molekulärbiologischen Untersuchung dieses klinisch so bedeutsamen Proteins.

REFERENZEN

- 1 Dai, G., Levy, O. und Carrasco, N. (1996) *Nature* 379, 458–460.
- 2 Smanik, P.A., Liu, Q., Furninger, T.L., Ryu, K., Xing, S., Mazzaferrari, E.L. und Jhjiang, S.M. (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 226, 339–345.
- 3 Smanik, P.A., Ryu, K.-Y., Theil, K., Mazzaferrari, E.L., und Jhjiang, S.M. (1997) *Endocrinol.* 138, 3555–3558.
- 4 Saito, T., Endo T., Kawaguchi, A., Ikeda, M., Nakazato, M., Kogai T. und Onaya T. (1997) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82, 3331–3336.
- 5 Behr, M., Ramsden, D., und Loos U. (1997) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82, 1081–1087.
- 6 Tong, Q., Ryu, K. und Jhjiang, S.M. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 239, 3441.
- 7 Endo, T., Kaneshige, M., Nakazato M., Ohmori, M., Harii N., und Onaya, T. (1997) *Molec. Endocrinol.* 11, 1747–1755.
- 8 Damante, G., und Di Lauro, R. (1994) *Biochim. Biophys. Acta* 1218, 255–263.

LEGENDEN

45

Abb. 1. Nukleotid-Sequenz der 5'-flankierenden Region des humanen NIS-Gens. Die Numerierung bezieht sich auf das ATG-Startcodon. Die putative TATA-Box ist eingerahmt und die GC-Box (Bindungsstelle für SP-1) ist unterstrichen. Zwei potentielle Bindungsstellen für TTF-1 (Konsensus-Sequenz: ACTCAAGTG/A) sind mit einer Schlangenlinie unterstrichen. Die in kursiv gesetzte Sequenz markiert den Überlapp mit der publizierten cDNA-Sequenz (2), die bei Nukleotid -347 beginnt.

Abb. 2. Graphische Darstellung der verwendeten Expressionsvektor-Konstrukte. Die 5'-flankierende Region des NIS-Gens und verschiedene Deletionen davon wurden in den Luciferase-Expressionvektor pGL3-Basic kloniert. Die Numerierung der Nukleotide bezieht sich auf das ATG-Startcodon.

Abb. 3. Stimulierung der Luciferase-Expression durch 5'-flankierende Sequenzen des humanen NIS-Gens. A) Transfektion von FRTL-5-Zellen. FRTL-5-Zellen wurden mit 6 µg pGL3-Konstrukten transfiziert, die verschiedene genomische DNA-Fragmente in "sense"- und "antisense"-Richtung enthielten. Daneben wurde 1 µg pSV-βGal als Kontrollvektor zugegeben. Nach der Transfektion wurden

die Zellen für 48 Std. inkubiert und die Luciferase-Aktivität gemessen und mit den β-Gal-Werten normalisiert. Die Luciferase-Aktivität des pGL3-Basic-Vektors alleine wurde als eins gesetzt, und die Werte für die Vektoren mit NIS-Fragmenten als Vielfaches davon angegeben. B) Transfektion von COS-7 und CHO-Zellen. Die Zellen wurden mit den Vektoren pGL3-NI-3 transfiziert, die NIS-Fragmente in "sense"-Richtung enthielten.

Abb. 4. Transkriptionelle Aktivierung des Luciferase-Gens in FRTL-5- und COS-7-Zellen durch Deletionen der 5'-flankierenden Region des NIS-Gens. pGL3 und verschiedene Deletionen davon (vgl. Abb. 2) wurden in COS-7- und FRTL-5-Zellen transfiziert. Die Messung der Luciferase-Aktivität und Berechnung der relativen Werte erfolgten wie in Abb. 3.

Abb. 5. Vergleich der 5'-flankierenden Sequenz aus der Ratte (oben) und dem Menschen (unten) für das NIS-Gen. Die Bezeichnung der funktionellen Elemente ist die gleiche wie in Abb. 1. Zusätzlich ist eine potentielle AP-1-Bindungsstelle mit einer gepunkteten Linie markiert. Die Transkription in der Ratte beginnt am letzten gezeigten Nukleotid (-98 relativ zum ATG-Startcodon).

Zusammenfassung

Die Schilddrüse hat die Fähigkeit, das Spurenelement Jod mit einem Konzentrationsfaktor von 40–80 aus der Blutbahn zu raffen. Schilddrüsenhormone entstehen durch Jodierung von Tyrosinen und deren Kopplung zu Thyroninen. Hierbei spielen Thyreoglobulin als Synthesematrix und Transporter, sowie das Enzym Schilddrüsen-Peroxidase als Katalysator die entscheidende Rolle. Die Jodspeicherung wird zur Darstellung der Schilddrüse nach Gabe von Spurdosen von Radiojod mittels Szintigraphie benutzt. Gleichermaßen kann mit höher dosierter Radiojodgabe eine Schilddrüsenüberfunktion behandelt werden. Mit hohen, d. h. ablativen Radiojoddosen können Schilddrüsenkarzinome und deren Metastasen behandelt werden. Leider speichern weniger als 20% der Schilddrüsenkarzinome bzw. deren Metastasen Radiojod, so daß die Radiojodtherapie hier sehr limitiert ist. Die Ursache für die fehlende Jodaufnahme ist noch nicht geklärt. Verantwortlich für die Jodaufnahme ist ein Membranprotein der Follikelzelle der Schilddrüse, das Jod zusammen mit Natrium in die Zelle transportiert (Natrium-Jod-Sympporter=NIS). Kürzlich konnte vom NIS-Gen die cDNA bei der Ratte (1) und schließlich auch beim Menschen (2) kloniert werden. Zwischen humaner und Ratten-Sequenz besteht eine Homologie von 85%. Von der cDNA ausgehend wurde unter Benutzung von genomischen Bibliotheken bei der Ratte von zwei Arbeitsgruppen die Promotorregion sequenziert und funktional charakterisiert. Allerdings wurden unterschiedliche Ergebnisse bezüglich Zellspezifität erhalten. Während einerseits Schilddrüsenspezifität beim Vergleich mit Leberzellen (3) postuliert wurde, konnte andererseits im Vergleich mit Fibroblasten bzw. neuroendokrinen Zellen (4) dies nicht nachvollzogen werden. Wir praktizieren einen neuen Approach, um die Promotorenregion beim Menschen zu identifizieren und zu sequenzieren. Ausgehend von der bekannten humanen NIS-cDNA, bzw. deren untranslatierten Sequenz benutzten wir das System der "genome walking" PCR (Polymerasekettenreaktion) von Clontech (Heidelberg). Hierbei werden Primet korrespondierend zu den bekannten untranslatierten Sequenz ausgewählt und mit upstream-Primern aus den bekannten Adapters der DNA von 5 humanen genomischen Bibliothek zur PCR-Amplifikation eingesetzt. Jede Bibliothek war durch Verdau mit jeweils einem spezifischen Restriktionsenzym und folgender Ligierung mit den Adapters entstanden. Wir konnten

zunächst 1402 Basenpaare upstream von der bekannten cDNA amplifizieren und in einen TA-Klonierungsvektor ligieren. Nach Sequenzierungen in beiden Richtungen charakterisierten wir, wie im Manuskript beschrieben, 2 verschiedene Regionen mittels Transfektionsassays (Luciferase-Assay) auf ihre transkriptionelle Aktivität. Die 602 Basenpaare umfassende 3'-Hälfte zeigte die höchste Aktivität in FRTL5-Zellen (fetal rat thyroid cell line) mit einer Aktivierung um das 17-fache bezogen auf den Basisvektor. Allerdings fanden wir auch in COS-Zellen (Affen-Nierenzellen) eine Aktivierung um das 10fache und in CHO-Zellen (Chinese hamster ovary cells) um das 4fache. Nach Korrektur auf die unterschiedliche Transfektionseffizienz ergab sich eine ca. 5fach höhere Transkriptionsaktivität in Schilddrüsenzellen (FRTL5) im Vergleich zu den Nicht-Schilddrüsenzellen. Durch gezielte Deletionen konnte diese Promotor-Aktivität auf Nukleotid -443 bis -395 relativ zum ATG-Startkodon eingeschränkt werden. Diese Region wies 74% Homologie über einen Bereich von 95 Basenpaare mit der entsprechenden Sequenz bei der Ratte auf und enthielt eine putative GC- und TATA-Box. Im übrigen zeigt unsere genomische Sequenz keine Homologie zu Promotorsequenzen von anderen schilddrüsenspezifischen Genen (Thyreglobulin, Thyreoid-Peroxidase, TSH-Rezeptor).

Die gesamte Sequenz wies einen GC-Gehalt von 54% auf und zeigte eine Häufung von CpG-Dinukleotiden um die putative Promotor-Region. Diese CpG-Inseln wurden als Substrat für regulierte Methylierung beschrieben, welche die Transkription blockieren kann. Dieser Mechanismus könnte eine Rolle im Sinne einer Hemmung der NIS-Genexpression in Schilddrüsen-Karzinomzellen spielen.

Mögliche Anwendung

Die hier erhobenen Ergebnisse und die daraus gewonnenen Erkenntnisse ermöglichen nicht nur den funktionalen Defekt des Jodtransporters zu analysieren, sondern auch zu reparieren. Die zugrundeliegenden Defekte in Schilddrüsen-Karzinomen sind auf verschiedenen Ebenen zu suchen.

Möglicherweise sind die schilddrüsenspezifischen Transkriptionsfaktoren des NIS-Gens defekt oder fehlen. Dabei handelt es sich vielleicht sogar um andere als die schon bekannten Transkriptionsfaktoren (TTF-1, TTF-2, PAX-8) oder sind die bekannten evtl. im Zusammenspiel mit noch unbekannten Enhancer-Sequenzen neu zu definieren. Zur Klärung dieser Fragestellung wird die von uns beschriebene spezifische NIS-Promotor-Sequenz verwendet werden können.

Auf der Basis der vorliegenden Ergebnisse und der neu zu definierenden Regulation der NIS-Promotor-Regulation wird es möglich werden, eine Restaurierung der NIS-Funktion in Schilddrüsenkarzinomzellen zu erreichen.

Eine bedeutende Rolle könnte auch die bei Karzinomen eventuell verstärkte Methylierung von Cytosinen spielen, da zahlreiche CpG-Dinukleotide in der beschriebenen Sequenz vorhanden sind, die bevorzugt methyliert werden. Diese Methylierung kann eine Hemmung der NIS-Genexpression bewirken.

Perspektiven

60

Die Kenntnisse der Regulierung der transkriptionellen Aktivierung der NIS-Genexpression wird es ermöglichen, das NIS-Gen in Metastasen von Schilddrüsenkarzinomen zu aktivieren. Ein zellspezifischer Transfer von auf das NIS-Gen wirkenden Transkriptionsfaktor(en) und dessen/deren Expression ist eine Möglichkeit. Hierfür ist das Erkennen von Target-Zellen, z.B. mittels viraler Vektoren mit zellspe-

zifischen Rezeptoren, Antikörper gegen Membranproteine von Karzinomzellen beladen mit Vektoren, Voraussetzung. Da das NIS-Gen selbstverständlich in allen Zellen inaktiv präsent ist, wird es durch zellspezifischen Transfer von NIS-spezifischen Transkriptionsfaktoren auch in anderen Krebszellen zu aktivieren sein.

Konkrete Ziele

10 Mit den hier gewonnenen Kenntnissen wird es möglich sein, die fehlende Funktion des Jodtransporters in den Metastasen von Schilddrüsenkarzinomen zu restaurieren und diese damit einer Radioiodtherapie zugängig zu machen.

15 Die Radiolyse hat den Vorteil, daß sie zelldestruierend wirkt, bevor Prozesse wie Resistenzentwicklung oder Autoimmunreaktion eine unüberwindbare Barriere gegen weiteren Gentransfer und seinen therapeutischen Erfolg aufbauen.

Durch Anschalten des Jodtransportergens in Krebszellen anderer Provenienz (Mamma, Pankreas) mittels zellspezifischem Transfer und Expression von NIS-Transkriptionsfaktoren werden auch diese Karzinome der Radioiodtherapie zugängig sein. Eine andere Möglichkeit wäre der Transfer von Vektoren, die die NIS-cDNA mit einem vorgesetzten zellspezifischen Promotor (z. B. beiu Pankreaskarzinom den Carboanhydrase-Promotor) enthalten.

Literatur

- 30 1 Dai, G., Levy, O. und Carrasco, N. (1996) Nature 379, 458-460.
- 2 Smanik, P.A., Liu, Q., Fumringer, T.L., Ryu, K., Xing, S., Mazzaferrri, E.L. und Jhiang, S.M. (1996) Biochem. Biophys. Res. Commun. 226, 339-345.
- 3 Endo, T., Kaneshige, M., Nakazato M., Ohmori, M., Harii N. und Onaya, T. (1997) Molec. Endocrinol. 11, 1747-1755.
- 4 Tong, Q., Ryu, K. und Jhiang, S.M. (1997) Biochem. Biophys. Res. Comm. 239, 34-41.

Patentansprüche

1. DNA, die als Promotor für das humane Iodtransporter-Gen (Gen für das Natrium-Iodid-Symporter-Protein; NIS) wirkt und dadurch gekennzeichnet ist, daß sie wenigstens die Nukleotide von -493 bis -395 der Nukleotidsequenz gemäß Abb. 1 oder der unteren Sequenz von Abb. 5 umfaßt.
2. DNA gemäß Abb. 1 oder eine funktionsgleiche DNA, die sich von der DNA gemäß Abb. 1 durch die Substitution, Deletion oder Insertion von einzelnen Nukleotiden oder Gruppen von Nukleotiden ableitet, soweit dadurch die Promotorfunktion und/oder die Bindung von Transkriptionsfaktoren für die Expression des humanen Iodtransportergens, verglichen mit einer DNA gemäß Abb. 1, verbessert oder nicht nennenswert beeinträchtigt werden.
3. Verwendung einer DNA nach einem der Ansprüche 1 oder 2 zur Erhöhung der Radioiodaufnahme bei der Radioiodtherapie von Karzinomen der Schilddrüse oder anderen Organen.
4. Verwendung nach Anspruch 3 in Form eines Vektors, der eine Promotor-DNA gemäß Anspruch 1 oder 2 in Verbindung mit der cDNA für den humanen Iodtransporter (NIS) und/oder mit cDNA für einen oder mehrere Transkriptionsfaktor(en) für den humanen Iodtransporter (NIS) enthält.
5. Verwendung nach Anspruch 4 in Form eines für die

jeweiligen Karzinomzellen spezifischen Vektors, der für die Verabreichung an menschliche Patienten per Injektion geeignet ist.

Hierzu 5 Seite(n) Zeichnungen

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

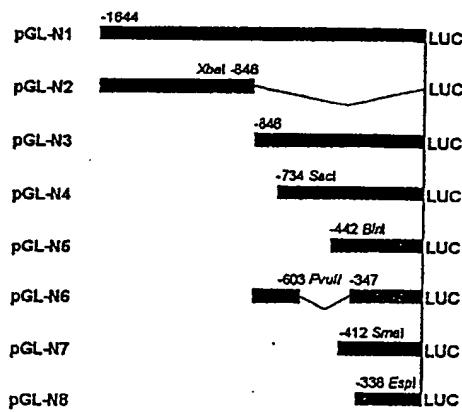
65

- Leerseite -

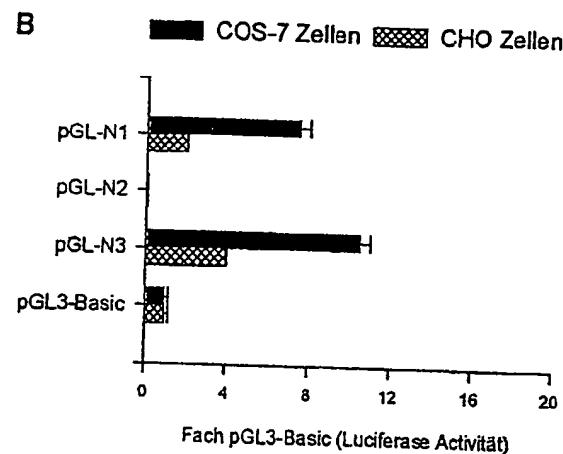
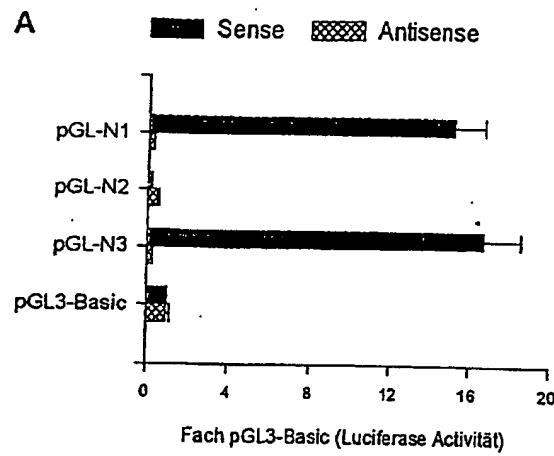
Abb. 1

-1644 ATTTGTATTTTCATACAGACAAGATCTCACTATGTTGCTCAGGGTAGTCTCAAATTCTGGGACTCAAAT
-1574 GATCCTCCCACTTCAGCCTCCAAAGTGCTGGGATTACAGGCATAAGCCATCATGCCCGGCCTGTGACGC
-1504 TGTTCCTTCAACCCCCAGGATTCAGATTCCACCAGCTTATGGAGAAGGAAACCAAGTTGAGATGCGT
-1434 GATTGCCAGAAAGTTGGAGGCTGAGCTGAGACTTGAAACCCAGAGACCAACCTCCAGAGGTCAAAGTC
-1364 CTCCTGGTCCCCAGAGAAGGGCCCTGAGATGACAGCTCGTGGTCCATGGAAGCGTGACCCCCCA
-1294 GTAGACTTCTCCCACACCCAACCTGGTTCTCATCTATATGATAAGGACAAGCCAGACTCTACCTCC
-1224 CTGGTGGTCATGGTCTCGCTTATCGGGTTCATAACCTAAAGGCCCTCGCACACCTCAGTGAGCCA
-1154 TTTATGCCTGGCACAGGGCAACTCTCAGTGCATATCTGCAAAGGAACCAATGAATGAGTGAATGAAGTG
-1084 ACAATGAATAAAGGAATAAATGAATGAGGCACTTATCATGTACCGAGCTTCGTTACCGTCCCATT
-1014 ATTCTCTGAGGCAGGGCTATTTATCCTGTTACAGATGGGAAACTAAGGCCAGGGAGGAGCAAAG
-944 TCTTCCCAAGTATGTAACCCTCAGAACCTGAGCTCTGAATGTCTCCACCCAGCTTAGCCCAAGAGCG
-874 GGGTTCACTGATGCCACCCCTAAGGCTCTAGAGAAAGGGGGTAGGCCACATGCCAGTTGGGGTGG
-804 TAAAGCCAGGTAAAGTTCTTATGGTCCCTGAAACCTGAAAGTGAACCCAGTCCTGCATGAAAGT
-734 GAGCTCCCCATAGCTCAAGGTATTCAAGCACAATACGGCTTGAGTGCTGAAGCAGGCTGTGAGGCTTG
-664 GATAGTGACATGCCCTCTGAGCCTCAATTCCCCACCTGTCACAGCAGACAGTGACAGCTGTGATCA
-594 GGGGATCACAGTCATGGGATGGGTGGTGCATGGGATGGAGGGCATTGGGAGCCCTCCCGATAC
-524 CACCCCCCTGCAGCCACCCAGATAGCCTGTCCTGGCCTGTCGTCCCAGTCCAGGGCTGAAAGGGTGCAGG
-454 TCCTGCCCGCCCTAGGTCTGGAGGCAGGCGGAGTCGCGGTGACCCGGGAGCCCAAATAAACTGCAACCCACAA
-384 TCACGAGCTGCTCCGTAAGCCCCAAGGCGACCTCCA

A68. 2



A 66.3



A66.4

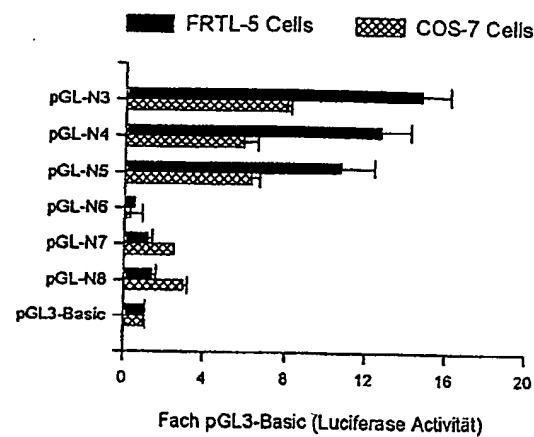


Abb. 5

```

-193 GGACCGAAAGGGTCGGGGTCGCGCCCGCCT
    ||| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
-472 GGGCTGAAAGGGTGCGGGTCCCTGCCCCGCC
CCCAGGCTGGGGGCGGAGCTGCGCTGACCCCCGGAG
    | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
CTAGGTCTGGAGGGCGGAGTCGCGGTGACCCGGAG
TTCATAAAATCCGCAGCGCAGAAAGCGAGTG - 98
    | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
CCCAATAAAATCTGCAACCCACAATCAGCAGC - 37

```

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.